W. Hul

1971

Aus der Frauenklinik der Universität des Saarlandes
Homburg/Saar
Direktor: Professor Dr. med. H. LIMBURG

ÜBER DIE WIRKUNG VON AUTOLOGEM UND HOMOLOGEM SERUM AUF EXPLANTIERTES NORMAL- UND KREBSGEWEBE

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1971

vorgelegt von

WILLY HUL

geb. am 1. November 1942 in Metz

DEKAN: Professor Dr. med. H. Kulenkampff
REFERENT: Priv.-Doz. Dr. med. Tranekjer

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung 1. 12. 1971

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
1. Carcinogenese	1
2. Tumorimmunologie	2
a) Immunologie der Zelle	2
b) Die Rolle des Komplements bei der Immunreaktion	3
c) Nachweis von Tumorantigenen	4
d) Antigene bei menschlichen Tumoren	6
3. Tumorabwehr beim Menschen	8
a) Vorbestehender immunologischer Defekt	8
b) Immunologische Toleranz	8
c) Immunparalyse	9
d) Sneaking through	1o
e) Immunsuppression durch Carcinogene	1o
f) Enhancement	11
g) Immunidentität durch Selektion	12
II. MATERIAL UND METHODE	13
1. Gewebsaufbereitung und Züchtung	13
2. Autoradiographie	15
3. Auswertung	16
4. Methodenkritik	18
a) Artefakte durch Aufbereitung des Materials	18
b) Artefakte durch Isotopenstrahlung	18
c) Artefakte durch Fixation	18

		Seite
	d) Artefakte durch Enzyme	19
	e) Artefakte durch Filmemulsion	19
	f) Artefakte während der Exposition	19
	g) Artefakte bei der Entwicklung und Fixation	2o
	h) Fehler bei der Auswertung	2o
III.	ERGEBNISSE	22
IV.	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	45
V.	ZUSAMMENFASSUNG	51
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	52

I. EINLEITUNG

1. Carcinogenese

In der Krebsgenese können wir exogene und endogene Faktoren unterscheiden, welche das Geschwulstwachstum auslösen, beziehungsweise fördern.
Bei den exogenen krebsauslösenden Noxen unterscheidet man drei große Stoffgruppen: Chemische Substanzen, ionisierende und ultraviolette Strahlen sowie Viren. Neben diesen Carcinogenen gibt es sogenannte Cocarcinogene, welche zwar primär keine maligne Transformation auslösen können, die aber die Krebsentstehung unterstützen und beschleunigen können (42, 49).
Von den endogenen Ursachen der Carcinogenese spielen vor allem konstitionelle und hormonelle Faktoren eine Rolle.
Allen diesen Faktoren ist eines gemeinsam, nämlich die Transformation der normalen Körperzelle in eine maligne Zelle. Über den molekularbiologischen Mechanismus dieser Transformation hat man bisher nur hypothetische Vorstellungen. Diskutiert werden die Mutationstheorie (7), die Mehrstufentheorie (9), die aerobe Glykolyse (1, 33, 66), eine Veränderung des endoplasmatischen Retikulums, welche die Matrizenaktivität der Messenger - RNS beeinflussen soll

(56), eine Schädigung der Lysosomenmembran durch Carcinogene, die zu einer Freisetzung von Enzymen führt, die dann mutagene auf die DNS einwirken sollen (2), ein Verlust der Wachstumskontrolle durch Entartung des kontrollierenden Enzymsystems (49) beziehungsweise des Chalon-Regelkreises (13) sowie die Deletionshypothese (17, 32).

2. Tumorimmunologie

In neuerer Zeit gewinnen immunologische Gesichtspunkte sowohl für die Tumorforschung als auch für die Therapie zunehmend an Bedeutung.
Die immunologische Tumorforschung stützt sich auf drei Hypothesen:

1. Es sind spezifische Tumorantigene vorhanden.
2. Diese Antigene werden von den immunkompetenten Zellen des Wirtes als fremd erkannt.
3. Es erfolgt eine entsprechende immunologische Reaktion.

a) Immunologie der Zelle

Antigene sind im allgemeinen höhermolukulare Substanzen, die eine Immunantwort auslösen, welche spezifisch gegen bestimmte Gruppierungen des Antigenmoleküls gerichtet ist. Diesen Molekularbezirk

nennt man determinante Gruppe. Als Antigene wirken nur solche Moleküle, die fremde determinante Gruppen besitzen. Gruppierungen des eigenen Organs rufen normalerweise keine Immunreaktion hervor. Ihrer chemischen Natur nach gehören die Antigene zu den Lipoglykoproteiden. Nach der Lokalisation unterscheidet man intrazelluläre Antigene, welche löslich und hitzelabil sind (27) und bei denen es sich meist um gewebs- oder organspezifische Antigene handelt. Sie spielen für die immunologische Reaktion keine Rolle. Daneben gibt es die Histokompatibilitätsantigene (H-Antigene), welche an der Zellmembran sitzen und eine Immunreaktion auslösen können. Form und Zahl der H-Antigene ist bei den verschiedenen Zellen unterschiedlich. Der Aufbau der H-Antigene ist genetisch festgelegt. Da es zahlreiche Gene gibt, welche H-Antigene determinieren, ist es unwahrscheinlich, daß zwei beliebige Individuen sich in ihrem H-Antigenmuster völlig gleichen (Ausnahme eineiige Zwillinge) (69).

b) Die Rolle des Komplements bei der Immunreaktion

Über die Art und Wirkung des Komplements hat man bisher folgende Vorstellung: Es besteht aus mehreren Komponenten, welche mit den Buchstaben C 1 bis C 9 bezeichnet werden und die bei der Elektrophorese

mit der Globulinfraktion wandern. Die Konzentration im menschlichen Serum beträgt 1oo bis 2oo ug/ml. Bei den komplementabhängigen Antigen-Antikörperreaktionen verbindet sich die-C 1-Komponente mit dem Antikörper, nachdem dieser mit dem Antigen der Zellmembran in Kontakt getreten ist. Die übrigen Komponenten verursachen dann durch enzymatische Wirksamkeit eine Permeabilitätssteigerung der Zellmembran, die zum Wassereinstrom in die Zelle führt und damit zur osmotischen Cytolyse (55). Das Komplement ist nur in frischem Serum vorhanden und wird durch Erhitzen auf 56° C zerstört.

c) Nachweis von Tumorantigenen

Tumorspezifische Antigene konnten in zahlreichen Tierversuchen sowohl bei virusinduzierten als auch bei chemischinduzierten Tumoren nachgewiesen werden. (3, 6, 12, 22, 46) Sie sind teils an der Zellmembran, teils im Zellinnern lokalisiert. Der Nachweis der Antigene erfolgt mit folgenden Methoden:

1. Abstoßung von Tumortransplantaten durch immunisierte Tiere.
2. Übertragung von Transplantationsimmunität mit immunologisch aktiven Zellen.
3. Hautteste
4. Serologische Teste

a) Cytotoxischer Test mit Hilfe von Antiserum

b) Immunfluoreszenztest

c) Immunpräzipitation in Agargel oder Agarose

d) Komplementbindungsreaktion

e) Markierung mit radioaktiven Stoffen zum Beispiel ^{125}J, ^{32}P (54, 59, 6o).

Diese Untersuchungen haben gezeigt, daß die chemisch induzierten Tumore ein individuell tumorspezifisches Transplantationsantigen enthalten. Dieses Antigen löst eine Reaktion vom allergischen Spättyp aus, das heißt es kommt bei immunisierten Tieren zur Abstoßung eines transplantierten Tumors durch sensibilisierte Immunocyten (5). Obwohl humorale Antikörper nachgewiesen wurden, welche in Abhängigkeit von Komplement cytotoxisch auf die Tumorzellen wirken (67), scheinen sie für die Tumorabwehr keine Rolle zu spielen (5, 28, 69). Dies deckt sich auch mit den Erkenntnissen der Transplantationsimmunologie, wo ebenfalls cytotoxische und agglutinierende Antikörper gegen Allotransplantate auftreten können, eine Übertragung der Transplantationsimmunität durch Serum der immunisierten Tiere jedoch nur unter besonderen Versuchsbedingungen gelingt (69).

Die virusinduzierten Tumore besitzen keine individuell tumorspezifische Antigene, sondern virusspezifische Antigene, das heißt alle durch ein bestimmtes Virus hervorgerufene Tumore besitzen die gleichen

spezifischen Tumorantigene. Auch hier handelt es sich um Transplantationsantigene, die der Gesetzmäßigkeit der Transplantationsimmunologie unterliegen (5, 22).

d) Antigene bei menschlichen Tumoren

In zahlreichen Veröffentlichungen wurde über die Auffindung von spezifischen Antigenen in menschlichen Tumoren berichtet (1o, 14, 16, 29, 41, 54). In Nachuntersuchungen konnte jedoch diese Spezifität nicht bestätigt werden. Auch verschiedene serologische Teste, welche auf dem Antigennachweis von Tumoren beruhen, wurden erarbeitet.
1955 gelang es MAKARI (47, 48) mit Hilfe der von SCHULZ und DALE angegebenen Methode Tumorantigene im Serum von Krebspatienten nachzuweisen. Der Test beruht auf der Sensibilisierung von Uterushörnern bei Meerschweinchen durch 2o %iges Homogenat aus Tumorgewebe. Bei Zusatz von Patientenserum auf den Uterus der getöteten Tiere kommt es zu einer Kontraktion der Uterushörner, welche elektronisch registriert wird. Sowohl bei MAKARI als auch später bei BURROW (15) fiel der Test in 96,7 % positiv aus. Der gleiche Prozentsatz negativer Ausfälle ergab sich bei einer Kontrollgruppe von Patienten.
MAASS und SCHNIEWIND (45) konnten diese Ergebnisse

nicht bestätigen. Bei ihren Untersuchungen zeigten nur 6 Carcinomseren von 56 einen positiven Ausfall. TRAMS und MAASS (64) konnten bei 93 untersuchten Seren nur 25 % positive Ergebnisse feststellen.

Der Malignolipintest beruht auf dem Nachweis von Malignolipin im Blut krebskranker Menschen. Dieser Stoff gehört zu den Phospholipiden und wird von der Krebszelle gebildet. Der Test ist bei 9o bis 96 % aller Krebspatienten positiv. Er kann aber auch bei nicht maligner Erkrankung innerer Organe positiv ausfallen (38).

LOSKANT (44) konnte mit Hilfe der Immunelektrophorese bei Patientinnen mit Collum-Carcinom weder tumorspezifische Antigene noch ein Verlust von organspezifischen Antigenen feststellen. Die Serumproteinveränderungen waren unspezifisch.
Alle bisher veröffentlichten Arbeiten zeigen, daß es bisher noch nicht möglich ist, tumorspezifische Antigene oder tumorspezifische serologische Veränderungen im Blut von Krebspatienten nachzuweisen.

3. Tumorabwehr beim Menschen

Obwohl die Erkenntnisse der Tumorabwehr beim Tier sowie der Erfolg der unspezifischen immunologischen Tumortherapie (4, 35) deutlich auf eine immunologische Tumorabwehr auch beim Menschen hinweisen, konnte, abgesehen von den in der Literatur beschriebenen etwa 2oo Spontanremissionen (5o, 62) maligner Tumoren, bisher kein sicherer Beweis für eine spezifische Abwehrreaktion bei malignen Erkrankungen erbracht werden. Als Ursache für das Versagen der spezifischen immunologischen Abwehr bei der Entstehung von Spontantumoren werden folgende Theorien genannt:

a) Vorbestehender immunologischer Defekt

Maligne Geschwülste treten häufiger bei Menschen und Tieren mit immunologischem Defekt auf. So sind perinatal thymektomierte Mäuse und Ratten anfälliger gegen chemische Carcinogene und onkogene Viren als Vergleichstiere. Bei Patienten mit Antikörpermangelsyndrom tritt häufiger eine Neoplasie auf als bei Gesunden (5, 34).

b) Immunologische Toleranz

Die immunologische Toleranz kommt dadurch zustande, daß Antigene während der Fetalperiode oder kurz nach der Geburt auf ein Individuum übertragen wer-

den. Das zu dieser Zeit noch unreife Immunsystem kann das Antigen nicht als fremd erkennen und bildet daher keine Antikörper. So kann das MTV-Virus der Maus von der Mutter durch die Muttermilch auf das Neugeborene übertragen werden und löst bei diesem ein Mammacarcinom aus. Obwohl dieses ein virusspezifisches Transplantationsantigen besitzt, wird keine Immunreaktion ausgelöst. Ähnliche Mechanismen könnten vielleicht auch beim Menschen eine Rolle spielen (26).

Nach BURNET und FENNER (zit. nach FLÜCKIGER (26)) besitzen die angeborenen Proteine einen Identitätsfaktor oder "Self-marker", der sie gegen die eigene Immunabwehr schützt. Auch eingebrachtes Fremdmaterial wird vom Embryo mit diesem Faktor markiert. Auch die Krebszellen sollen nach dieser Theorie den "Self-marker" besitzen, so daß sie vom eigenen Immunsystem nicht erkannt werden können, selbst wenn sie Fremdprotein enthalten.

c) Immunparalyse

Hierunter versteht man die Unterdrückung der Immunreaktion durch die Zufuhr einer übermäßig großen Antigenmenge. Man stellt sich vor, daß im Anfang der Tumorentstehung die Antigenkonzentration zu ge-

ring ist, um eine entsprechende Immunreaktion auszulösen, bei einer bestimmten Größe des Tumors jedoch eine Immunparalyse erfolgt (5, 2o).

d) Sneaking through

Unter "sneaking through" oder dem Hindurchschleichen von Tumorzellen durch die immunologische Schranke, versteht man die Tatsache, daß bei der Transplantation von sehr wenigen sowie von sehr vielen Tumorzellen auf isogenetische Tiere, diese Transplantate angehen, während bei einer mittleren Dosis das Transplantat abgestoßen wird. Man erklärt sich diese Beobachtung folgendermaßen: einmal soll der antigene Stimulus zu gering sein, beziehungsweise eine Desensibilisierung und damit eine Immuntoleranz hervorrufen, im anderen Falle kommt es zu einer Immunparalyse. Auf diese Weise könnte also ein Spontantumor ungehindert wachsen und bei einer bestimmten Größe eine immunsuppressive Wirkung ausüben (5, 26).

e) Immunsuppression durch Carcinogene

Gewisse chemische Carcinogene besitzen eine ausgesprochene immunsuppressive Wirkung. Man nimmt an, daß diese Immunsuppression ein wichtiger Schrittmacher bei der Entstehung chemisch induzierter Tumore ist. Immunsuppressive Substanzen begünstigen

aber auch das Wachstum von Spontantumoren, was durch das gehäufte Auftreten von Neoplasien bei Patienten, die mit Immunsuppressiva behandelt wurden, ersichtlich ist (5, 26).

Die Tatsache, daß bei Krebspatienten im Terminalstadium die Immunreaktion vom verzögerten Typ fast vollkommen danieder liegt, im Gegensatz zur humoralen Abwehr, hat zur Annahme geführt, daß vom Tumor selbst eine immunsuppressive Wirkung ausgeht.

f) Enhancement

Hierunter versteht man die Begünstigung des Tumorwachstums durch humorale Antikörper (5, 28, 65). Man nimmt an, daß die Antikörper die Antigenkontaktstellen der Tumorzellen besetzen und damit der Kontakt mit den Immunocyten unterbleibt und somit auch die Immunreaktion vom verzögerten Typ. Die humoralen Antikörper sollen keinen wesentlichen cytotoxischen Effekt besitzen (5, 65).

Dieses Enhancement soll auch bei der Ausbreitung des Choriocarcinoms eine Rolle spielen. Dieses entwickelt sich aus dem kindlichen Trophoblasten und enthält daher mütterliche und väterliche Transplantationsantigene und müßte daher als Homotransplantat von der Mutter abgestoßen werden. Daß dieses nicht der Fall ist, wird auf das Enhancement zurückgeführt (5).

g) Immunidentität durch Selektion

FLÜCKIGER (26) nimmt eine Immunidentität oder Proteinidentität der Krebszelle an. Die aus der Linie fallende Proteine, die in jeder Evolutionskette vorkommen, sollen durch das feindliche Milieu vernichtet werden. Der Milieufaktor, gemeint ist die Immunabwehr oder eventuell das Krebsgeschwulst selbst, läßt nur der immunidentischen Krebszelle eine Lebenschance.

Obwohl also eine spezifische immunologische Tumorabwehr beim Menschen bisher nicht nachgewiesen werden konnte, beobachteten wir bei der Suche nach einem geeigneten Nährmedium für explantierte Tumorgewebe, zwecks Resistenztestung gegenüber Cytostatika, daß in einer Reihe von Fällen autologes menschliches Serum auf die jeweiligen Kulturen cytotoxisch wirkte, weswegen wir später Kälberserum benutzten, daß diesen cytotoxischen Effekt nicht zeigte.
In der vorliegenden Arbeit soll daher die Wirkung von autologem und homologem Serum auf menschliches Normal- und Tumorgewebe in vitro näher untersucht werden.

II. MATERIAL UND METHODE

1. Gewebsaufbereitung und Züchtung

Durch Operation und Biopsie gewonnenes Patientengewebe wurde nach dem Trypsinierungsverfahren von DULBECCO und VOGT (21), modifiziert nach LIMBURG und KRAHE (43), in Leightontubes kultiviert. Zunächst wurde das gewonnene Gewebe in einer Phosphatpufferlösung aufgefangen, die einen Zusatz von Antibiotika enthielt (o,2 ml Streptomycin und 1oo E/ml Penicillin). Ein Teil des Gewebes wurde zwecks histologischer Untersuchung entnommen. Das zur Kultur vorgesehene Gewebsstück wurde mit sterilen Leinentupfern von Blutbeimengungen und nekrotischen Anteilen befreit. Anschließend erfolgte eine mechanische Zerkleinerung des Gewebes mit einer Schere und eine fermentative Aufspaltung in Einzelzellen mittels einer Trypsinlösung. Die Konzentration der Lösung betrug bei weichem markigem Gewebe o,25 %, bei festem Gewebe 2 %. Die Trypsinierung erfolgte in einem Kolben im Brutschrank bei 37° C, wobei das Verfahren durch einen Magnetrührer beschleunigt wurde. Der Trypsinierungsprozeß dauerte je nach Beschaffenheit des Gewebes zwischen 1o und 3o Minuten. Die überstehende Flüssigkeit wurde in einen sterilen Kolben gegossen, der bei 4° C im Eisbad aufbewahrt wurde. Dieser Vorgang wurde bis zur vollständigen Auflö-

sung des Gewebes wiederholt. Die Zellsuspension wurde dann durch eine sterile Mullage gefiltert und anschließend zentrifugiert und resuspendiert. Das trypsinhaltige Zellsediment wurde dann mit einer Phosphatpufferlösung ausgewaschen. Danach wurden die Zellen mit dem Nährmedium versehen, wobei jeweils etwa 4 bis 6 Millionen Zellen in einem ml Medium suspendiert wurden und jeweils 1 ml dieser Suspension in ein Leightontubes gefüllt wurde. Als Nährmedium wurde verwendet:

TCM 199 (Morgan-Morten-Parker)	25,o
Kälberserum	1o,o
Vitamin Solution	5,o
Glutamin 1o %	5,o
Hanks Solution	55,o

Nachdem auf den Glimmerplättchen ein einschichtiger Zellrasen ausgewachsen war, was mikroskopisch festgestellt wurde, fügten wir pro Leightontube 1 ml autologes beziehungsweise homologes Patientenserum hinzu. Das Blut wurde am Operationstag oder am Tag darauf entnommen, zentrifugiert und bis zur Verwendung im Kühlschrank bei - 2o^{o} C aufbewahrt. Als Inkubationszeit wählten wir anfangs 24 Stunden. Da in dieser Zeit jedoch die Kultur so stark geschädigt wurde, daß eine Auszählung der Zellen nicht mehr möglich war, verkürzten wir die Inkubationszeit auf

2. Autoradiographie

Zur Markierung der in der DNS-Synthesephase sich befindenden Zellen wurde H^3-Thymidin mit einer spezifischen Aktivität von 2 C/m Mol und einer Konzentration von 2 uC/ml verwendet. (Über die theoretischen Grundlagen der Autoradiographie siehe 24, 25, 36, 37, 51, 52, 53, 54, 57, 58, 63, 64). Die Inkubationszeit des H^3-Thymidins betrug 12o Minuten. Anschließend erfolgte die Fixation in Äther/Alkohol (5o : 5o) unter Zusatz von einem Tropfen Essigsäure (99,9 %) pro einem Liter Äther/Alkohol für 3o Minuten unter Verwendung spezieller Glimmerplättchenständer. Die Essigsäure diente der Verhinderung einer chemischen Autoradiographie durch Austreten intrazellulärer Enzyme bei der Fixation. Da nach dieser Fixierung stets zahlreiche Vakuolen in den Zellen auftraten, die eine morphologische Beurteilung erschwerten, haben wir später folgendes Fixationsmittel benutzt:

Formaldehyd (35 %)	9o ml
Aqua bidest.	9o ml
Äthanol (95 %)	75 ml
Essigsäure (99,9 %)	5 ml

Bei dieser Fixation konnte die Anzahl der Vakuolen vermindert werden.

Nach der Fixation wurden die Glimmerplättchen mit

der Schichtseite nach oben auf Objektträger aufgeklebt und für 2 Stunden in einen Exsikkator gebracht, um die Essigsäure zu entfernen. Dann wurden die Präparate mit der Fotoemulsion Ilford G 5 (bezogen in der Verdünnung 1 : 3 mit Aqua bidest. von Sandoz, Basel) überschichtet und 3 Wochen im Kühlschrank bei 4^{o} C aufbewahrt. Die Überschichtung der Autoradiogramme erfolgte bei absoluter Dunkelheit. Die Objektträgerkasten wurden zur Vermeidung von Strahleneffekten in schwarzem Papier und Staniolpapier eingewickelt.

Entwicklung

Die Entwicklung und Fixation der Autoradiogramme erfolgte bei $2o^{o}$ C und absoluter Dunkelheit. Anschließend wurden sie nach Papanicolaou gefärbt. Dann wurden die Glimmerplättchen mit der Schichtseite nach unten in Cedax eingebettet.

3. Auswertung

Es wurde der H^3-Index bestimmt durch Auszählen von 3 ooo Zellen pro Autoradiogramm.

$$H^3\text{-Index } (\%) = \frac{\text{Zahl der markierten Zellen . 1oo}}{\text{Zahl der ausgezählten Zellen}}$$

Der H^3-Index gibt einen Hinweis auf die Größe der Zellproliferation beziehungsweise auf die mittlere Lebensdauer (Generationszeit) einer Zellpopulation. Die Generationszeit läßt sich aus der Formel

$$\frac{\text{DNS-Phase}}{H^3\text{-Index (\%)}}$$

aus dem H^3-Index berechnen, wobei die DNS-Synthesephase als konstante Größe angesehen werden kann und zwischen 6 und 8 Stunden liegt (24). Gleichzeitig wurde die cytotoxische Wirkung des futologen beziehungsweise homologen Serums auf die Zellpopulation im Vergleich mit den Kontrollen beurteilt. Hierbei haben wir die cytotoxische Wirkung in 4 Grade eingeteilt:

Ø	: keine Wirkung
+	: geringe Wirkung
++	: starke Wirkung
+++	: sehr starke Wirkung

Von jeder Gewebsprobe wurden mehrere Kulturen angelegt und ausgewertet. Von diesen Kulturen wurde jeweils der H^3-Index bestimmt und das arithmetische Mittel dieser Werte in den folgenden Tabellen eingetragen. Insgesamt wurden 18o Autoradiogramme ausgewertet.

4. Methodenkritik

a) Artefakte durch Aufbereitung des Materials

In unseren Versuchen wurden nur Kulturen verwendet, bei denen mikroskopisch ein gleichmäßig ausgewachsener Zellrasen vorlag. Dadurch konnte die Verwendung von mechanisch oder bakteriell geschädigtem Gewebe ausgeschlossen werden.

b) Artefakte durch Isotopenstrahlung

Eine morphologische und funktionelle Schädigung der Zellen sowie eine Depression der DNS-Synthese durch eine zu starke Strahlung der Isotopen wurde von ODEBLAD (52) beschrieben. Bei der von uns gewählten Konzentration von 2 u C/ml ist die Strahlenbelastung jedoch so gering, daß eine wesentliche Strahlenschädigung nicht zu erwarten ist und auch in Kontrollpräparaten nicht festgestellt werden konnte.

c) Artefakte durch Fixation

Eine Einwirkung des Fixationsmittels, besonders der Essigsäure und des Formalins auf die Filmemulsion ist möglich. Durch die zweistündige Nachbehandlung der fixierten Präparate im Exsikkator konnte diese Einwirkung verhindert werden.

d) Artefakte durch Enzyme

Artefakte, welche durch den Austritt von Enzymen aus der Zelle entstehen, wurden durch den Zusatz von einem Tropfen 99,9 %iger Essigsäure zu dem Fixationsmittel verhindert.

e) Artefakte durch Filmemulsion

Artefakte durch Verwendung geschädigter Filmemulsion konnte durch den Gebrauch standardisierter und frisch angesetzter Filmemulsion sowie deren Aufbewahrung im Kühlschrank verhindert werden.

f) Artefakte während der Exposition

Pseudophotographische Effekte durch chemische Reaktion zwischen Gewebe und Filmemulsion sind möglich. Es müssen daher stets Kontrollpräparate ohne Radioisotope mitgeführt werden. Artefakte, welche durch eine unterschiedliche Länge der Expositionszeit entstehen können, wurden durch eine einheitliche Expositionszeit von 3 Wochen für alle Kulturen vermieden. Eine zu hohe Feuchtigkeit in den Objektträgerkästen, welche zu einer Schwellung der Gelatine und damit zu einer Beeinflussung der geometrischen Lage der Silberbromidkristalle in der Filmemulsion führen könnten, wurde durch Zugabe von Kupfersulfat in die Objektträgerkästen verhindert.

g) Artefakte bei der Entwicklung und Fixation

Artefakte während der Entwicklung und Fixation wurden weitgehend ausgeschaltet durch Arbeiten bei absoluter Dunkelheit, Verwendung jeweils frisch angesetzter Lösungen gleicher Temperatur und durch Vermeidung mechanischer Insulte.

h) Fehler bei der Auswertung

Die Fehler bei der Bestimmung des H^3-Indexes haben wir gering gehalten durch Auszählen einer großen Zahl von Zellen (3 ooo Zellen pro Autoradiogramm) sowie durch Auszählen an verschiedenen Punkten des Präparates, wodurch ein repräsentatives Ergebnis gewährleistet wurde. Eine Verwechslung markierter Zellen mit Artefakten ist wegen der strengen Lokalisation des H^3-Thymidin im Zellkern und der dadurch entstehenden charakteristischen Markierung des Zellkernes ziemlich gering. Es konnten aber auch, besonders bei nekrotischen Zellen, Silberkristalle über dem ganzen Zelleib gefunden werden.

Die Bestimmung der cytotoxischen Wirkung des autologen beziehungsweise homologen Serums erfolgte durch Vergleich mit den in Kälberserum inkubierten Kontrollen. Da wir eine Signifikanz aber nur annahmen, wenn sich der Schädigungsgrad der mit mensch-

lichem Serum inkubierten Zellen von den Kontrollautoradiogrammen um mindestens 2 Grade unserer Einteilung unterschied und dieser Unterschied mit großer Wahrscheinlichkeit abgelesen werden kann, glauben wir, daß unseren Ergebnissen eine ausreichende Sicherheit zugrunde liegt.

III. ERGEBNISSE

In tabellarischen Übersichten haben wir einmal die Wirkung von Patientenserum auf autologe beziehungsweise homologes Gewebe, gemessen am H^3-Index, der Auswachszeit und der morphologischen Wirkung, im Vergleich mit unbehandelten Kontrollen gegenüber gestellt (Tabelle 1 - 8), während wir in den Tabellen 9 - 13 die Wirkung verschiedener homologer Seren auf ein Gewebe mit der Wirkung von autologem Serum beziehungsweise Kälberserum verglichen haben.

Tabelle 1: Wirkung von Serum 1293 (ORh^+) auf folgende Gewebe:

Gewebe	Auspflanzzeit (Tagen)	Inkubation mit autol. Serum	H^3-Index Kontrolle	H^3-Index autol. Serum	Morphol. Wirkung
1293: Cystisch glandulär. hyperpl. Endometrium (ORh^+)	4	24 h	o,14	o,86	+++
14o7: Funktionierendes Endometrium (A_1Rh^+)	4	5 h	3,o	3,4	++
1398: Carcinoma ovarii adenomatosum (ORh^+)	5	5 h	o,o1	o,o8	+
1391: Normales Ovar (ORh^+)	4	5 h	o,o4	o,o1	+
1396: Carcinoma ovarii adenomatosum (Netzmetastase) (BRh^+)	5	5 h	4,5	1,o	+
Wirkung von Serum 14o4 (A_1Rh^+) auf folgende Gewebe					
14o4: Entdifferenziertes Ovarialcarcinom (A_1Rh^+)	5	5 h	4,8	3,7	+

Tabelle 2: Wirkung von Serum 1296 (BRh^+) auf folgende Gewebe:

Gewebe	Auspflanzzeit (Tagen)	Inkubation mit autol. Serum	H^3-Index Kontrolle	H^3-Index autol. Serum	Morphol-Wirkung
1296: Normale Portio (BRh^+)	4	5 h	2.1o	1,1o	++
13o9: Undiff. anaplast. Ovarialcarcinom (A_2Rh^+)	4	5 h	o,1o	o,55	++
1314: Papillomatöses entdifferenziertes Ovarialcarcinom (A_1rh^-)	4	5 h	3,7o	1,8o	+++
1358: Normales Ovarium (ORh^+)	5	5 h	o,o3	o,oo	+
1366: Entdifferenziertes Ovarialcarcinom (Ascites) (ORh^+)	3	5 h	o,o3	o,18	++
1367: Entdifferenziertes Ovarialcarcinom (ORh^+)	3	5 h	o,13	o,19	+
14o7: Funktionierendes Endometrium (A_1Rh^+)	4	5 h	3,oo	2,2o	++

Tabelle 3: Wirkung von Serum 13o6 (ORh^+) auf folgende Gewebe:

Gewebe	Auspflanz-zeit (Tagen)	Inkubation mit autol. Serum	H^3-Index Kontrolle	H^3-Index autol. Serum	Morphol. Wirkung
13o6: Adenocarcinoma corporis uteri (ORh^+)	7	5 h	1,o	o,96	++
1358: Normales Ovarium (ORh^+)	5	5 h	o,o3	o,o8	+
1314: Papillomatöses entdiff. Ovarial-carcinom ($A_1rh\emptyset$)	4	5 h	3,7	1;6	++
1396: Ovarialcarcinom (Netzmetastase) (BRh^+)	5	5 h	4,5	4,7	+
Wirkung von Serum 1294 (ORh^+) auf folgende Gewebe:					
1294: Normales Ovar (ORh^+)	4	24 h	o,o4	o,o2	++

Tabelle 4: Wirkung von Serum 1358 (ORh^+) auf folgende Gewebe:

Gewebe	Auspflanzzeit (Tagen)	Inkubation mit autol. Serum	H^3-Index Kontrolle	H^3-Index autol. Serum	Morphol. Wirkung
1358: Normales Ovar (ORh^+)	5	5 h	o,o3	o,o8	+
14o4: Entdifferenziertes Ovarialcarcinom (A_1Rh^+)	5	5 h	4,8	2,o	Ø
Wirkung von Serum 14o1 (A_1Rh^+) auf folgende Gewebe					
14o1: Atrophisches Ovar (A_1Rh^+)	2	5 h	o,o	o,o	+
14o4: Entdifferenziertes Ovarialcarcinom (A_1Rh^+)	5	5 h	4,8	2,2	Ø
Wirkung von Serum 1314 (A_1rh^-) auf folgende Gewebe					
1314: Papillomatöses entdiff. Ovarialcarcinom (A_1rh^-)	4	5 h	3,7	1,3	++
1358: Normales Ovar (ORh^+)	5	5 h	o,o3	o,o3	+

Tabelle 5: Wirkung von Serum 1364 (Brh^-) auf folgende Gewebe:

Gewebe	Auspflanzzeit (Tagen)	Inkubation mit autol. Serum	H^3-Index Kontrolle	H^3-Index autol. Serum	Morphol. Wirkung
1364: Corpuscarcinom (Brh^-)	4	5 h	o,o5	o,o6	++
139o: Mammacarcinom (Pleurapunktat) (ORh^+)	3	5 h	1,2	1,7	+
1391: Normales Ovar (ORh^+)	4	5 h	o,o4	o;o1	+
	Wirkung von Serum 1289 (A_1Brh^-) auf folgende Geweb				
1289: Atrophisches Endo-Myometrium ($A_1BrhØ$)	4	24 h	2,o4	1,8	++
13o6: Adenovacarcinoma corporis uteri (ORh^+)	7	5 h	1,o	o,91	++
13o9: Undiff. anaplast. Ovarialcarcinom (A_2Rh^+)	6	5 h	o,1	o,33	++

Tabelle 6: Wirkung von Serum 1366 (ORh^+) auf folgende Gewebe:

Gewebe	Auspflanzzeit (Tagen)	Inkubation mit autol. Serum	H^3-Index Kontrolle	H^3-Index autol. Serum	Morphol. Wirkung
1366: Entdifferenziertes Ovarialcarcinom (Ascites) (ORh^+)	3	5 h	o,o3	o,o6	++
Wirkung von Serum 1367 (ORh^+) auf folgende Gewebe:					
1367: Entdifferenziertes Ovarialcarcinom (ORh^+)	3	5 h	o,13	o,23	+
Wirkung von Serum 13o9 (A_1Rh^+) auf folgende Gewebe					
13o9: Undifferenziertes anaplast. Ovarialcarcinom (A_2Rh^+)	6	5 h	o,1	o,55	+
14o7: Funktionierendes Endometrium (A_1Rh^+)	4	5 h	3,o	1,8	++

Tabelle 7: Wirkung von Serum 1396 (BRh^+) auf folgende Gewebe:

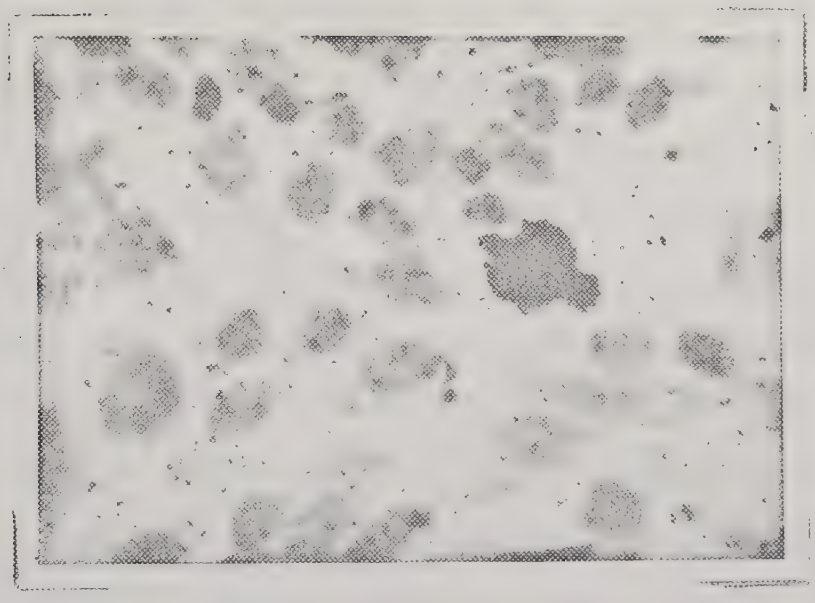
Gewebe	Auspflanz-zeit (Tagen)	Inkubation mit autol. Serum	H^3-Index Kontrolle	H^3-Index autol. Serum	Morphol. Wirkung
1396: Carc.ovarii adenomatosum (Netzmetastase) (BRh^+)	5	5 h	4,5 %	4,9 %	++
Wirkung von Serum 1395 (BRh^+) auf folgende Gewebe					
1395: Carcinoma ovarii adenomatosum (BRh^+)	5	5 h	o,o1 %	o,o1 %	+
Wirkung von Serum 1367 (ORh^+) auf folgende Gewebe					
1367: Entdifferenziertes Ovarialçarcinom (ORh^+)	3	5 h	o,13 %	o,23 %	+
Wirkung von Serum 1391 (ORh^+) auf folgende Gewebe					
1391: Normales Ovar (ORh^+)	4	5 h	o,o4	o,o1	+

Tabelle 8: Wirkung von Serum 139o (ORh^+) auf folgende Gewebe

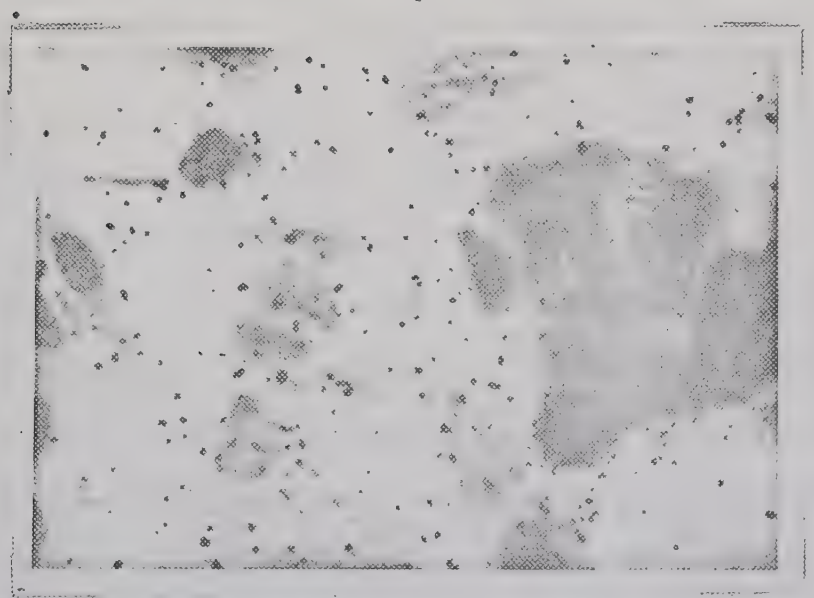
Gewebe	Auspflanzzeit (Tagen)	Inkubation mit autol. Serum	H^3-Index Kontrolle	H^3-Index autol. Serum	Morphol. Wirkung
139o: Metastasierendes Mammacarcinom (Pleurapunktat) (ORh^+)	3	5 h	1,2	1,5	+
14o7: Funktionierendes Endometrium (A_1Rh^+)	4	5 h	3,o	3,4	++
1391: Normales Ovar (ORh^+)	4	5 h	o,o4	o,o3	+
Wirkung von Serum 14o7 (A_1Rh^+) auf folgende Gewebe					
14o7: Funktionierendes Endometrium (A_1Rh^+)	4	5 h	3,o	o,59	++
Wirkung von Serum 14o2 (ORh^+) auf folgende Gewebe					
14o2: Normales Endometrium in beginnender Funktion (ORh^+)	3	5 h	o,95	1,o	++

Tabelle 9

Gewebe	Auspflanz-zeit (Tg)	Autologe Wirkung: Inkubat.mit autol.Serum	H^3-Index Kontrolle	H^3-Index aut.Serum	Morphol. Wirkung	Homologe Wirkung: Homologes Serum	H^3-Index hom.Serum	Morphol. Wirkung
1293: Cystisch glanduläres hyperplast.Endometr.	4	24 h	0,14	0,86	+++	1289: Atrophisch Endo-Myometrium	1,20	+++
1402: Normales Endometrium in beginn. Funktion	3	5 h	0,95	1,00	++	1386: Ovarial-Ca.	0,75	ø
						1304: Corpus-Ca.	0,75	+
1407: Funktionierend. Endometrium	4	5 h	3,00	0,60	++	1390: Mamma-Ca.	3,40	++
						1293: Norm.Endom.	3,40	++
						1390: Ovarial-Ca.	1,30	++
						1295: Dysplasie d. Portio uteri	1,50	++
						1309: Ovarial-Ca.	1,80	++
						1296: Uterusmyom	2,20	++
						1305: Corpus-Ca.	4,00	++
1289: Atroph. Endo-Myometrium	4	24 h	2,40	1,80	++	1363: Ovarial-Ca.	0,08	++
						1359: Norm. Ovar	0,10	++
1296: Normale Portio	3	5 h	0,05	0,06	++			



14o2: Normales Endometrium in beginnender Funktion
(Kontrolle)
Auspflanzzeit: 3 Tage
H^3-Index: o,95

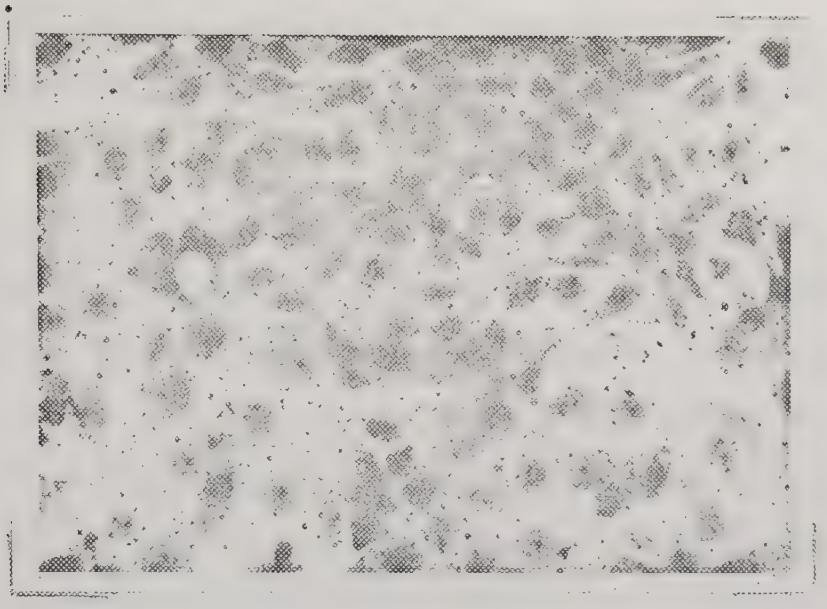


14o2: Nach Zugabe von autologem Serum
Inkubationszeit: 5 Stunden
H^3-Index: 1,o
Morphologische Wirkung: ++

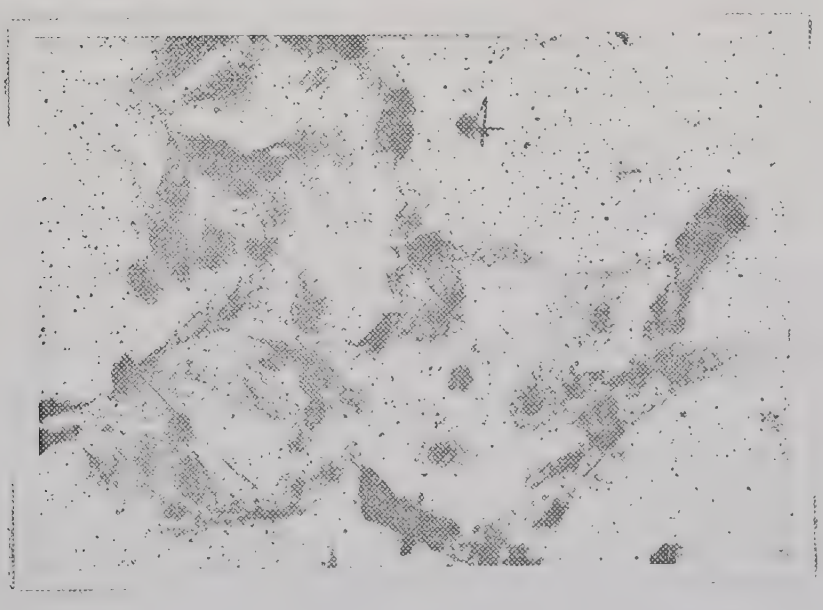
Bei vier untersuchten nichtcarcinomatösen Endometrien (Tabelle 9) zeigte der H^3-Index eine unterschiedliche Größe; er schwankte zwischen o,14 % und 3,oo %. Nach Zugabe von autologem Serum ließ sich keine einheitliche Wirkung feststellen. Bei einem Gewebe blieb der H^3-Index gleich (14o2), bei einem stieg er an (1293) und bei zwei Geweben nahm er ab (14o7) und (1289). Die Wirkung des homologen Serums war ebenfalls nicht einheitlich. Es fand sich ein gleichbleibender, ansteigender und abnehmender H^3-Index bei meist deutlicher cytotoxischer Wirkung. Eine signifikant unterschiedliche Wirkung zwischen dem Serum carcinomatöser Patienten und nichtcarcinomatöser beziehungsweise gesunder Patientinnen konnte nicht festgestellt werden. Vergleicht man den H^3-Index mit der morphologischen Wirkung so stellt man fest, daß fast durchweg eine starke cytotoxische Wirkung (Zellnekrose, Pyknose, Kernverlust, Zusammenbacken von Zellverbänden) vorhanden ist, der jedoch nicht mit der Größe des H^3-Indexes korreliert. Dieses Ergebnis war sowohl nach Zugabe von autologem, als auch nach Zugabe von homologem Serum feststellbar. Bei einem untersuchten normalen Portiogewebe ergab sich bei deutlicher cytotoxischer Wirkung eine Verminderung des H^3-Indexes von 2,1 % auf 1,4 %.

Tabelle 10

Gewebe	Auspflanz-zeit (Tg)	Autologe Wirkung: Inkubat.mit autol.Serum	Autologe Wirkung: H^3-Index Kontrolle	Autologe Wirkung: H^3-Index aut.Serum	Autologe Wirkung: Morphol. Wirkung	Homologe Wirkung: Homologes Serum	Homologe Wirkung: H^3-Index hom.Serum	Homologe Wirkung: Morphol. Wirkung
1364: Carcinoma adenomatosum et papillosum corporis uteri	4	5 h	0,05	0,06	++	1363: Ovarial-Ca.	0,08	++
						1359: Ovarial-Ca.	0,10	++
1306: Adenocarcinoma corporis uteri	7	5 h	1,00	0,90	++	1289: Atrophisch. Endometrium	0,90	++
1390: Mammacarcinom (Pleurapunktat)	3	5 h	1,20	1,50	+	1364: Corpus-Ca.	1,70	+
						1359: Ovarial-Ca.	1,10	++
						1386: Ovarial-Ca.	2,20	++



1364: Carcinoma corporis uteri (Kontrolle)
Auspflanzzeit: 4 Tage
H^3-Index: o,o5



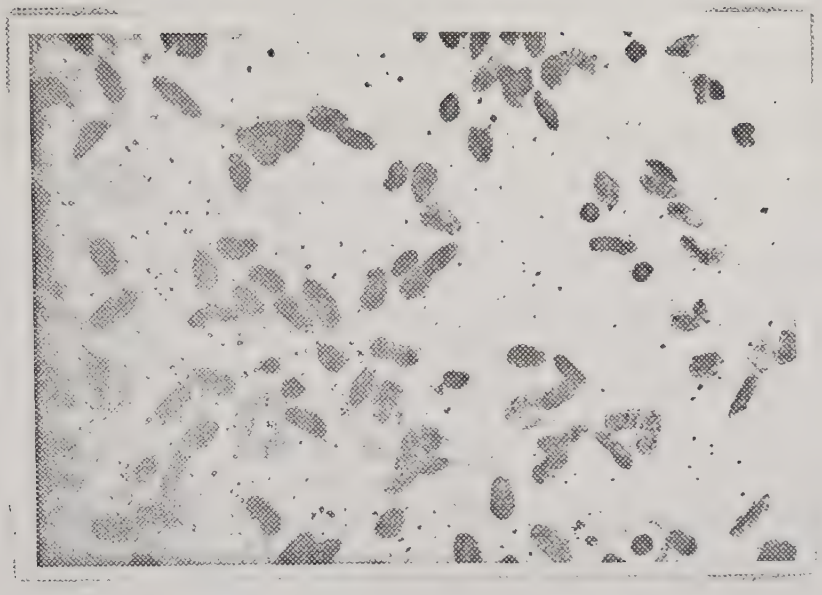
1364: Nach Zugabe von autologem Serum
Inkubationszeit: 5 Stunden
H^3-Index: o,o6
Morphologische Wirkung: ++

Die beiden untersuchten Adenocarcinome des Uterus (Tabelle 1o) zeigten einen unterschiedlichen H^3-Index (o,o5 % und 1 %). Nach Zugabe von autologem Serum blieb der H^3-Index annähernd konstant bei gleichzeitiger starker cytotoxischer Schädigung der Kulturen durch das autologe Serum. Homologes Serum zweier Patienten mit Ovarialcarcinom (1363 und 1359) führte bei der Kultur 1364 zu einem Anstieg des H^3-Index bei starker cytotoxischer Wirkung. Das Serum einer Patientin mit atrophischem Endometrium (1289) führte bei der Kultur 13o6 zu einer starken Schädigung der ausgepflanzten Zellen bei unverändertem H^3-Index.

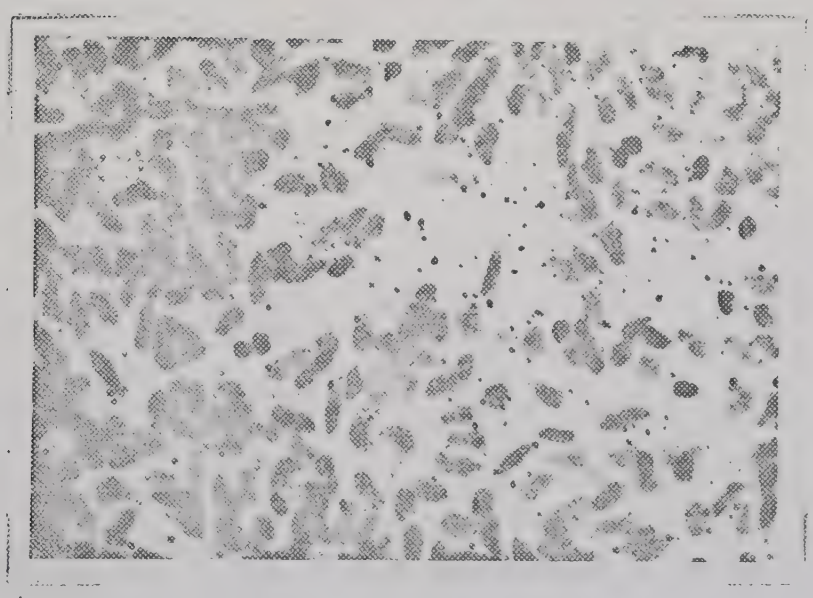
Die explantierten Pleurapunktatzellen einer Patientin mit Mammacarcinom (139o) wurden bei Zugabe von autologem Serum nur gering geschädigt, bei gleichzeitigem Anstieg des H^3-Indexes. Die homologen Seren hatten eine unterschiedliche Wirkung auf den H^3-Index und die Morphe der Kultur.

Tabelle 11

Gewebe	Auspflanz-zeit (Tg.)	Autologe Wirkung: Inkubat.mit autol.Serum	H^3-Index Kontrolle	H^3-Index aut.Serum	Morphol. Wirkung	Homologe Wirkung: Homologes Serum	H^3-Index hom.Serum	Morphol. Wirkung
1294:Normales Ovar	4	24 h	0,04	0,02	++			
1358:Normales Ovar	5	5 h	0,03	0,08	+	1314:Ovarial-Ca.	0,03	+
						1296:Norm.Portio	0,00	+
						1306:Corpus-Ca.	0,08	+
1391:Normales Ovar	6	5 h	0,10	0,55	+	1364:Corpus-Ca.	0,01	ø
						1293:Norm.Endom.	0,01	+
						1390:Mamma-Ca,	0,03	++
1401:Atroph. Ovar	2	5 h	0,00	0,00	+	1386:Ovarial-Ca.	0,00	+



1401: Atrophisches Ovar (Kontrolle)
Auspflanzzeit: 2 Tage
H^3-Index: 0,00

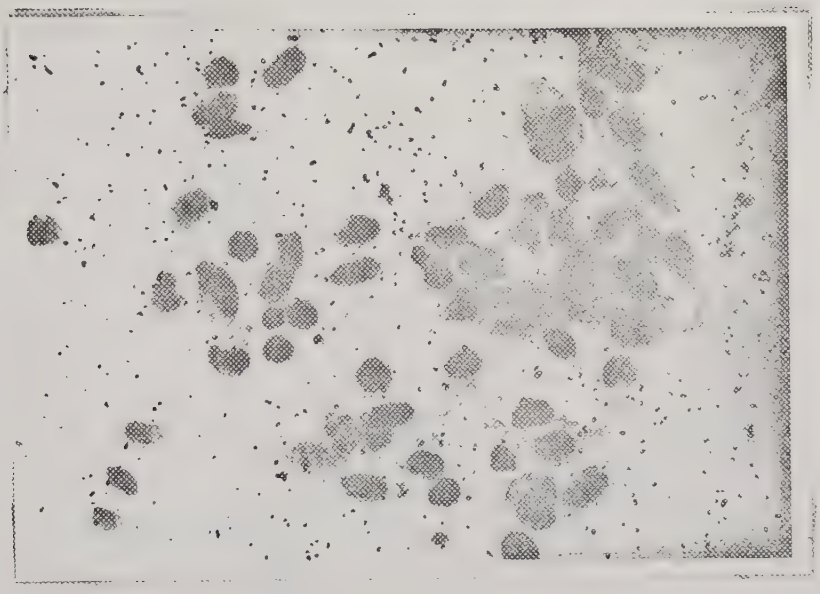


1401: Nach Zugabe von autologem Serum
Inkubationszeit: 5 Stunden
H^3-Index: 0,00
Morphologische Wirkung: +

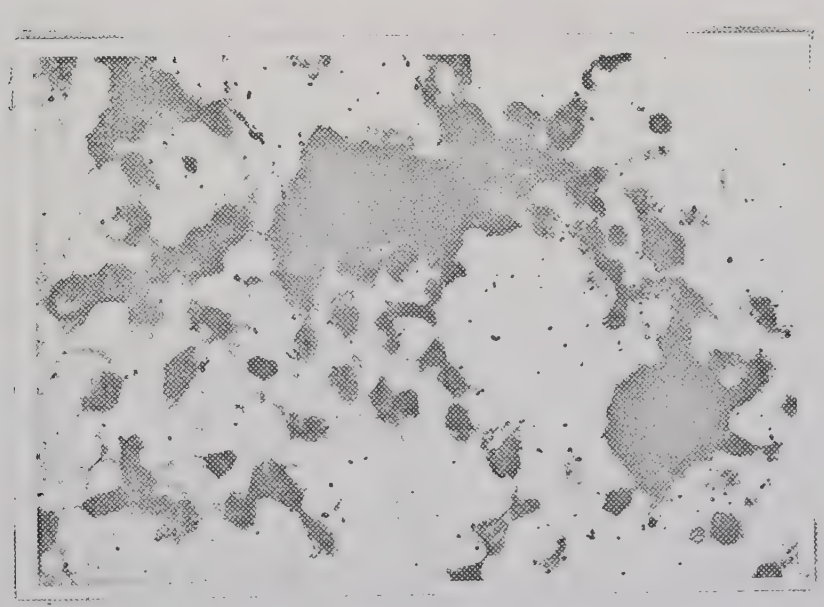
Das ausgepflanzte normale beziehungsweise atrophische Ovarialgewebe (Tabelle 11) zeigte einheitlich einen niedrigen H^3-Index. Nach Zugabe von autologem Serum änderte sich die Größe des H^3-Indexes nur gering beziehungsweise blieb konstant. Die cytotoxische Wirkung des autologen Serums war mit einer Ausnahme (1924) gering. Nach Zugabe von homologem Serum, zeigte der H^3-Index wiederum nur eine geringe Veränderung und der cytotoxische Effekt war meist gering oder negativ. Eine signifikant unterschiedliche Wirkung zwischen den homologen Seren von Patienten mit Carcinom und solchen ohne Carcinom bestand nicht.

Tabelle 12

Gewebe	Auspflanz-zeit (Tg.)	Autologe Wirkung: Inkubat.mit autol.Serum	H^3-Index Kontrolle	H^3-Index aut.Serum	Abweich-ung in %	Morphol. Wirkung	Homologe Wirkung: Homologes Serum	H^3-Index hom.Serum	Morphol. Wirkung
1367:Entdiff. Ovarial-Ca.	3	5 h	0,13	0,23	+ 77	+	1296:Norm.Portio	0,19	+
							1359:Ovarial-Ca.	0,18	++
1395:Carc.ovarii adenomatosum	5	5 h	0,01	0,01	0,0	+	1293:Norm.Endom.	0,08	+
							1364:Corpus-Ca.	0,26	ø
1396:Carc. ovarii adenomatosum (Netzmetastase)	5	5 h	4,50	4,90	+ 8	++	1364:Corpus-Ca.	7,60	ø
							1293:Norm.Endom.	1,00	+
							1306:Corpus-Ca.	4,70	+
1404:Entdiff. Ovarial-Ca.	5	5 h	4,80	3,70	-	+	1402:Norm.Endom.	5,60	+
							1358:Norm. Ovar	2,00	ø
							1401:Atroph.Ovar	2,20	ø



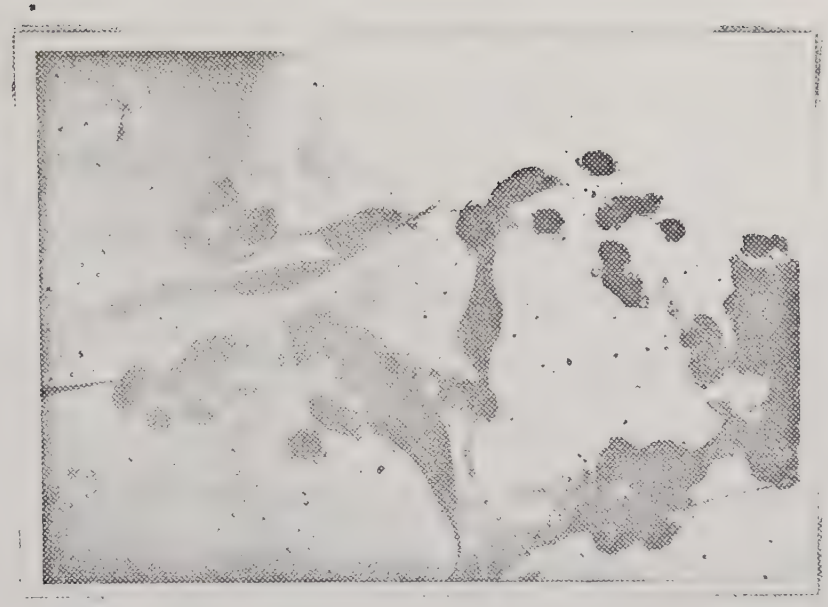
1367: Entdiff. Ovarial-Ca. (Kontrolle)
Auspflanzzeit: 3 Tage
H^3-Index: o,13



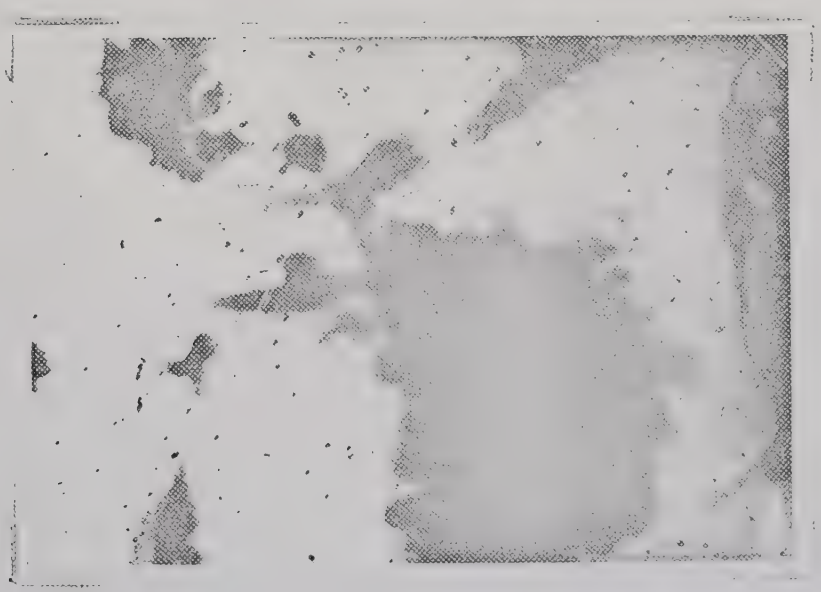
1367: Nach Zugabe von autologem Serum
Inkubationszeit: 5 Stunden
H^3-Index: o,23
Morphologische Wirkung: +

Tabelle 13

Gewebe	Auspflanz-zeit (Tg.)	Autologe Wirkung: Inkubat.mit autol.Serum	H^3-Index Kontrolle	H^3-Index aut.Serum	Morphol. Wirkung	Homologe Wirkung: Homologes Serum	H^3-Index hom.Serum	Morphol. Wirkung
1309: Undiff. anaplastisches Ovarial-Ca.	6	5 h	0,10	0,55	+	1289: Atroph.Endom.	0,33	++
						1296: Norm. Portio	1,20	++
1314: Papillomatöses entdiff. Ovarial-Ca.	4	5 h	3,70	1,30	++	1289: Atroph.Endom.	2,40	++
						1316: Uterus-Sarkom	3,20	+++
						1306: Corpus-Ca.	1,60	++
						1296: Uterusmyom	1,80	+++
1366: Entdiff. Ovarial-Ca. (Ascites)	3	5 h	0,03	0,06	+	1359: Ovarial-Ca.	0,06	+++
						1296: Norm. Portio	0,18	++



1366: Entdiff. Ovarial-Ca. (Kontrolle)
Auspflanzzeit: 3 Tage
H^3-Index: o,o3



1366: Nach Zugabe von autologem Serum
Inkubationszeit: 5 Stunden
H^3-Index: o,o6
Morphologische Wirkung: +

Bei den explantierten Ovarialcarcinomen (Tabelle 12 und 13) fällt der niedrige H^3-Index bei der Mehrzahl der Kulturen auf. Nach Zugabe von autologem Serum verhielt sich der H^3-Index unterschiedlich. Die cytotoxische Wirkung der autologen Seren war meist gering und korrelierte nicht mit der Größe des H^3-Indexes. Auch nach Zugabe von homologen Seren war die cytotoxische Wirkung und das Verhalten des H^3-Indexes uneinheitlich. Eine signifikant unterschiedliche Wirkung von homologen Seren nichtcarcinomatöser und carcinomatöser Patientinnen bestand nicht.

IV. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Bei den von uns untersuchten 19 Geweben zeigte sich nach Zugabe von autologem Patientenserum in allen Fällen eine Schädigung der Kulturen, welche von unterschiedlicher Stärke war. Nach Zugabe von homologem Serum zeigte sich bei 46 untersuchten Kulturen in 6 Fällen ein negatives Ergebnis. Erstaunlich dabei war, daß trotz morphologischer Beeinflußbarkeit der Kulturen, keine signifikante Veränderung im H^3-Thymidineinbau erkennbar war. Auffallend war auch das Verhalten des explantierten Ovarialgewebes. Bei 3 untersuchten histologisch normalen und einem atrophischen Ovarialgewebe (Tabelle 11) ergab sich ein sehr niedriger H^3-Index (o,o - o,1). Gleichzeitig zeigte sich sowohl nach Zugabe von autologem als auch nach Zugabe von homologem Serum nur ein geringer cytotoxischer Effekt. Bei 7 untersuchten Ovarialcarcinomen (Tabelle 12 und 13) war bei 4 Geweben der H^3-Index ebenfalls sehr niedrig (zwischen o,o1 und o,1) bei gleichzeitig geringer cytotoxischer Wirkung des autologen Serums, während nach Zugabe von homologem Serum die cytotoxische Wirkung sehr unterschiedlich war, jedoch auffallend viele negative beziehungsweise schwach positive Ergebnisse festgestellt wurden.

Bei ähnlichen in der Literatur beschriebenen Ver-

suchen, welche der Auffindung von Tumorantikörpern im Serum von Krebspatienten beziehungsweise der Untersuchung von cytotoxischen Substanzen im menschlichen und tierischen Serum galten, waren die Ergebnisse unterschiedlich.

GRAHAM and GRAHAM (31) injizierten 114 Patienten mit fortgeschrittenem Tumor Homogenate beziehungsweise Zellsuspensionen ihres eigenen Tumors in Freundschem Adjuvans. Hiervon lebten 55 % mehr als 7 Monate und 14 % waren nach anschließender Bestrahlung klinisch geheilt. Die Autoren sind der Meinung, daß durch die Vaccination möglicherweise der Effekt der anschließenden Radiotherapie potenziert werde.

Die gleichen Autoren untersuchten bei 48 Patienten mit gynäkologischem Krebs das Serum auf Antikörper gegen das wässrige Extrakt des autochthonen Tumors mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion (3o). Bei 12 Patientinnen fanden sie Antikörper gegen den eigenen Tumor. Der Titer lag zwischen 1 : 16 und 1 : 128. In einem Fall reagierte das Serum einer Patientin mit Antikörpern mit dem Extrakt eines homologen Tumors. Es handelt sich um das Serum einer Patientin mit Cervix-Carcinom, welches mit dem Extrakt eines Vaginal-Carcinoms reagierte (Titer 1 : 64).

Die Seren von Normalpatientinnen zeigten gegen das eigene Normalgewebe keine Aktivität. Bei 21 Seren von Normalpatientinnen, welche mit den Extrakten von 3 Tumoren getestet wurden, zeigte sich in einem Fall eine Reaktion.

CUNNINGHAM (18) immunisierte 42 Patientinnen mit fortgeschrittenem Krebs verschiedener Typen mit Extrakten des autologen Tumorgewebes. Bei 36 Patientinnen, welche für die Auswertung in Betracht kamen, zeigte sich nur in einem Fall eine nachweisbare Tumorregression. Eine Reaktion vom verzögerten Typ war nicht nachweisbar. Auch ein Tumorwachstum aufgrund eines Enhancement-Phänomens konnte nicht festgestellt werden.

KINZEL (4o) prüfte die Einwirkung von Kaninchenserum auf den Dauerstamm eines Walker-Ascites-Carcinoms. Verwendet wurde normales Kaninchenserum und Serum nach mehrwöchiger Immunisierung der Tiere mit Zellen des Walker-Ascites-Carcinoms. Hierbei zeigte sich, daß von den Normalseren einzelne primär cytotoxisch wirkten. Die übrigen Normalseren führten zur reversiblen Abkugelung der Zellen. Das Serum der immunisierten Tiere führte zur vollständigen Cytolyse aller Zellen der Kulturen. Die Reaktion war komplementabhängig.

WISSLER und FLAX (68) konnten im Serum von Patientinnen mit Brustkrebs Substanzen nachweisen, die cytotoxisch auf Dauerstämme von menschlichen Brustkrebszellen wirkten. Der cytotoxische Effekt war am stärksten, wenn das Serum kurz nach der Entfernung des primären Tumors entnommen wurde. Sie schlossen daraus, daß möglicherweise cytotoxische Substanzen, welche vorher von den Tumorzellen beziehungsweise deren Produkten gebunden wurden, nach der Entfernung des Tumors verstärkt im Blut erscheinen.
In einer anderen Untersuchung fand WISSLER (67) sowohl in normalen menschlichen Seren als auch in Seren von Krebspatienten cytotoxische Substanzen in der Nähe der $alpha_1$-Globulinfraktion. Nach seiner Meinung handelt es sich wahrscheinlich um ein proteolytisches Enzym.

BENO et al. (8) untersuchten 176 hitzeinaktivierte menschliche Seren auf ihre cytotoxische Wirkung gegenüber Dauerstämmen heterologer normaler (WI-38) und neoplastischer (Hela, HEp-2, KB) Zellen. 84 % der Seren wirkten auf die HEp-2-Kultur toxisch bei einem Titer zwischen 1 : 2 und 1 : 128. Mit Hilfe der doppelten Mikroimmundiffusion konnten die cytotoxischen Substanzen in der Präalbuminfraktion des Serums festgestellt werden.

Dieser Befund deckt sich mit der Untersuchung von BJÖRKLUND (11) der ebenfalls in der Präalbuminfraktion einen Eiweißkörper fand, der ohne Komplement cytotoxisch wirkte, während FEDOROFF (23) eine Substanz fand, die nur in Gegenwart von Komplement eine Cytolyse bewirkte.

KELLER (39) fand in der Globulinfraktion des menschlichen Serums eine Substanz, welche auf Peritonealzellen von Ratten cytotoxisch wirkte. Der Autor nimmt an, daß es sich um eine Cla-Esterase handelt, welche die Zellmembran der Zellen so verändert, daß ein anderer Faktor, der hitzelabil ist und nicht in der Euglobulinfraktion vorhanden ist, die Zellen dann zerstören kann. Menschliches Gammaglobulin allein wirkte nicht cytotoxisch.

Nach STETSON (61) können auch die menschlichen Isoantikörper cytolytisch wirken, sowohl auf normale Zellen als auch auf neoplastische Zellen. Er hält es für wahrscheinlich, daß kein Zelltyp völlig resistent gegen die humoralen Isoantikörper ist. Die menschlichen Isoantikörper können auch passiv gegen Zelltransplantate von normalen und neoplastischen Zellen immunisieren. Die Ursache liegt darin, daß Hämagglutinogene nicht nur in der Erythrocytenmembran vorhanden sind, sondern auch in den Membranen

anderer Zellen. So haben DAVIDSON und NI (19) 127 Biopsien eines sicheren oder fraglichen Bronchialcarcinoms auf Isoantigene A, B und H untersucht. Sowohl bei Entzündungen als auch bei Hyperplasie und Metaplasie des Bronchialepithels waren die Isoantigene nachweisbar. Bei den Bronchialcarcinomen wurden jedoch bei über 9o % der Fälle keine Isoantigene mehr gefunden. Die Autoren deuten dies als ein Zeichen der Entdifferenzierung des Krebsgewebes.

Aufgrund der geschilderten Untersuchungen anderer Autoren sowie unserer eigenen Ergebnisse halten wir es für erlaubt, einen bisher nicht näher definierten cytotoxischen Faktor anzunehmen, dessen Angriffspunkt die Zellmembran ist. Eine weitere Deutung unserer Befunde ist innerhalb unseres Versuchsansatzes nicht möglich. Die Ergebnisse bieten aber einen interessanten Ansatzpunkt einer Therapiemöglichkeit auf autoimmunologischer Basis.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe der Züchtungsmethode nach DULBECCO und VOGT, modifiziert nach LIMBURG und KRAHE, und der autoradiographischen Untersuchungstechnik mit H^3-Thymidin wurde die Wirkung von autologem und homologem Patientenserum auf explantiertes normales und neoplastisches Gewebe untersucht. Insgesamt wurden 9 normale Gewebe (Ovar, Endometrium, Portio uteri) und 1o maligne Gewebe (Ovarial-Ca., Uteri-Ca. und Mamma-Ca.) untersucht. Jedes Gewebe wurde mit Kälberserum (Kontrolle), autologem und homologem Serum unter Zusatz von H^3-Thymidin inkubiert. Es wurde der H^3-Index und die morphologische Schädigung der Zellen bestimmt und mit den Kontrollautoradiogrammen verglichen. In fast allen Versuchen zeigte sich eine deutliche cytotoxische Wirkung nach Zusatz von autologem und homologem Serum, die nicht in Beziehung stand zu dem Wert des H^3-Indexes und von Gewebe zu Gewebe verschieden war. Die Wirkung des autologen und homologen Serums wurde auf cytotoxische Substanzen im menschlichen Serum zurückgeführt.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. AISENBERG, A.C. : The Glycolysis and Respiration of Tumors. Academic Press. Publishers New York, London, 1961

2. ALLISON, A.C. : Lysosomes in Relation to Cancer. Induction and Treatment. Europ. J. of Cancer 3, 481, 1968

3. ALLISON, A.C. : Cell-mediated immune responses to virus infections and virusinduced tumors. Brit. med. Bull. 23, 6o, 1967

4. AUDIER, A.G. : Immunotherapie metastasierender Malignome. Die Medizinische 4o, 186o, 1959

5. BARANDUN, S. : Tumorimmunologie Praxis 56, 1653, 1967

6. BASES, R. : Antigenic differences between normal and polyoma virus transformed cells. II. In vitro evidence for a virus-induced antigen. Cancer Res. 24, 1216, 1964

7. BAUER, K.H. : Das Krebsproblem. Springer-Verlag 1963

8. BENO, D.W., LYTLE, R.J. and EDWARDS, E.A. : Immunological and Biological Studies of a Cytotoxic Component from Human Sera. J. of Nat. Cancer Inst. 42, 899, 1969

9. BERENBLUM, J. : A Re-evaluation of the Concept of Cocarcinogenesis. Progr. in Exp. Tumors Res. 11, 21, 1969

1o. BJÖRKLUND, B., BJÖRKLUND, V. and HEDLÖF, J. : Antigenicity of pooled human malignant and normal tissues

by cytoimmunological technique III. Distribution of tumors antigen.
J. of Nat. Cancer Inst. 26, 533, 1961

11. BJÖRKLUND, B. : A serum cytolytic factor active against HeLa and other established cell strains.
Proc. Soc. Exp. Biol. 1o3 1, 196o

12. BOYLE, W. and DAVIES, D.A.L. : Antigens of the surface of mouse ascites tumour cells I. Studies with rabbit antimouse cell sera.
Immunology 11, 353, 1966

13. BULLOUGH, W.S. : Mitotic and Functional Homeostasis: A Speculative Review.
Cancer Res. 25, 1683, 1965

14. BURROWS, D.,MD, NEIL, D.W., M.Sc., F.R.J.C. : Investigation of the immunologically active contsituent of serum of patients with carcinoma.
Brit. Med. J. 1, 368, 1958

15. BURROWS, D. : Schulz-Dale test for detection of specific antigen in sera of patients with carcinoma.
Brit. Med. J. 1, 368, 1958

16. BURTIN, KLEIST, RAPP : Auto-anticorps chez les cancéreux.
La Presse Med. 46, 2599, 1965

17. BUSCH, H. : Biochemistry of the Cancer Cell.
Academic Press 1962

18. CUNNINGHAM, T.J., MD, OLSON, K.B., MD, LAFFIN, R., PHD, HORTON, J., MB, CHB an SULLIVAN, J. MD : Treatment of advanced cancer with active immunization.
Cancer 24, 932, 1969

19. DAVIDSON, J., NI,L.Y. : Loss of isoantigens A, B and H in carcinoma of the lung.
Amer. J. Path. 57, 3o7, 1969

2o. DRESSER, D.W. and MITCHISON, N.A. : The Mechanism of Immunological Paralysis.
Adv. in Immunology 8, 129, 1968

21. DULBECCO, R. and VOGT, M. : Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis virus.
J. Exp. Med. 99, 161, 1954

22. EGGERS, H.J. : Viren als Krankheitserreger.
Deutsch.Med. Wochenschrift 9, 473, 197o

23. FEDOROFF, S., DOERR, J. : Effect of bood serum on tissue cultures. III. A natural cytotoxic system in human blood serum.
J. of Nat. Cancer Inst. 29, 331, 1962

24. FETTIG, O. : H^3-Index-Bestimmung und -Berechnung der mittleren Generationszeit (Lebensdauer) der Einzelabschnitte des gesunden und krankhaften Endometriums nach autoradiographischen Untersuchungen mit H^3-Thymidin.
Gynäkologie 2oo, 639, 1965

25. FITZGERALD, P.J., EIDINOFF, M.L., KNOLL, J.E. and SIMMEL, E.B. : Tritium in Radioautography
Science 114, 494, 1951

26. FLÜCKIGER, P. : Theorien zur Immunindentität des Krebses.
Praxis 35, 1185, 1967

27. GALLMEIER, W.M. und OETTGEN, H.F. : Tumorimmunologie.
Deutsch- Med. Wochenschrift 93, 1114, 1968

28. GERICKE, D. : Aspekte der Immuntherapie maligner Tumoren. Med. Klin. 63, 1143, 1968

29. GOLD, P. and FREEDMAN, S.O. : Demonstration of tumor-spezific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. J. Exp. Med. 121, 439, 1965

3o. GRAHAM, J.B. and GRAHAM, R.M. : Antibodies Elicited By Cancer IN Patients. Cancer 8, 4o9, 1955

31. GRAHAM, J.B., MD,F.A.C.S. and GRAHAM, R.M.,ScD : The Effect of Vaccine on Cancer Patients. Surg. Gynecol. Obstet. 1o9, 131, 1959

32. GREEN, H.W., ANTHONY,H.M., BALDWIN, R.W. and WESTROP, J.W. : An immunological approach to cancer. Butterworths London 1967

33. GREENSTEIN, J.P. : Biochemistry of Cancer. Academic Press Inc., Publishers New York, 1954

34. GROSS, L. : Immunological defect in aged population and its relationship to cancer. Cancer 18, 2o1, 1965

35. HACKMANN, Ch. : Über die Bedeutung exogener und endogener Allgemeinfaktoren für das Wachstum maligner Geschwülste. Deutsch. Med. Wschr. 83, 134, 1958

36. HABERS, E. und NEUMANN, K. : Autoradiographie als histochemische Methodik. Klin. Wschr. H. 15, 16, 22, 1954

37. HARMS, J.G. : Probleme der Resistenzbildung bei der zytostatischen Behandlung von Karzinomen.

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät Der Universität des Saarlandes 1969

38. KALLISTRATOS und TIMMERMANN : Früherkennung maligner Tumorrezidive durch den Malignolipin-Blut-Test. XII. Congres National de Chirurgie in Bukarest 22. - 26. 5. 196

39. KELLER, R. : Some Factors affecting the cytotoxic immune reaction of rat mast cells. Nature 212, 947, 1966

4o. VON KINZEL : Über die Cytolyse von Tumorzellen in vitro durch Antiserum. Zeitschrift für Krebsforschung. 68, 2o9, 1966

41. VON KLEIST, S. and BURTIN, P. : On the Specifity of Autoantibodies Present in Colon Cancer Patients. Immunology 1o, 5o7, 1966

42. KUSCHINSKY, G. und LÜLLMANN, H. : Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie. Thieme Verlag Stuttgart 197o

43. LIMBURG, H., KRAHE, M. : Die Züchtung von menschlichem Krebsgewebe in der Gewebekultur und seine Sensibilitätstestung gegen neue Zytostatika Deutsch. Med. Wschr. 89, 1938, 1964

44. LOSKANT, G. : Untersuchungen zur Immunologie und Proteinstruktur des Carcinoma colli uteri. Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi für das Fach Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Hohen Med. Fakultät der Universität des Saarlandes Homburg/Saar 1969

45. MAAS, H. und SCHNIEWIND, H. : Der immunologische Krebstest nach MAKARI. Klin.Wschr. 38, 1164, 196o

46. Mc KENNA, J.M., SANDERSON, R.P. and BLAKEMORE, W.S. : Studies of antigens of human tumors I. Demonstration of soluble antigens in HeLa celles and some human tumors. Cancer Res. 24, 754, 1964

47. MAKARI, J.G. : Use of Schultz-Dale test for detection of specifique antigen in sera of patients with carcinoma. Brit. med. J. II, 1291, 1955

48. MAKARI, J.G. : Detection of antigens in sera of patients with neoplastic disease by Schultz-Dale test. Brit. med. J. II, 358, 1958

49. MARKS, F. : Biochemie und Krebs. Hippokrates, H. 19, 1969

5o. MEYER, H. und BIESOLD, W. : Selbstheilung einer diffusen Bauchfellkarzinose. Dtsch. Gesundheitsw. 18, 621, 1963

51. NIKLAS, A., MAURER, W. : Autoradiographie. Hoppe-Seyler/Thierfelder. Analyse, Bd. II, 1o. Aufl.

52. ODEBALD, E. : Artefacts in Autoradiography. Acta Radiologica 39, 192, 1953

53. OEHLERT, W., LESCH, R. : Autoradiographische Untersuchungen an menschlichen Geweben und Zellen. Deutsch. med. Wschr. 91, 194o, 1966

54. OETTGEN, H.F. und GALLMEIER, W.M. : Tumorimmunologie. Erfahrungen am Menschen. Deutsch. med. Wschr. 93, 1157, 1968

55. OSLER, A.G. : Function of the Complement System.
Advances in Immunology 1, 132, 1961

56. PITOT, H.C. and YOON SANG CHO : Control Mechanism in the Normal and Neoplastic Cell.
Progr. in Exper. Tumor Res. Karger, S. Basel, New York, Bd. VII, 159, 1965

57. POWSNER, E. : On the Use of Thymidine H^3- in Tissue Culture.
Appl. Radiation and Isotopes, 18, 1967

58. RAPP, W. : Möglichkeiten serologischer Krebsdiagnostik.
Deutsch. med. J. 15, 597, 1964

59. RAPP, W. : Tumorimmunität.
Ärztl. Fortb. 16, 175, 1966

6o. SOUTHHAM, C.M. : Relationships of immunology to cancer.
A review
Cancer Res. 2o, 271, 196o

61. STETSON, C.A. : The Role of Humoral Antibody in the Homograft Reaction.
Advances in Immunology 3, 97, 1963

62. SUMNER, W.C. and FORBAKTER, A.G. : Spontaneous regressions of human melanoma.
Clinical and experimental studies.
Cancer 13, 79, 196o

63. TITUS, J.L., MD and SHORTER, R.G., MD : Labeling of Human Tumors With Tritiadet Thymidine
Arch. of Pathology 79, Number 3, 1965

64. TRAMS, G. and MAAS, H. : Einige Überlegungen zur Immunologie des Krebses mit Untersuchungen zum Makari-Test.
Zbl. f. Gynäk. 87, 223, 1965

65. UHR, J.W. and MÖLLER, G. : Immunological Enhancement of Tissue Grafts. Advances in Immunology 8, 111, 1968

66. WARBURG, O. : The Metabolism of Tumors. Constable and Co., London 193o

67. WISSLER, R.W. : Effects of cytotoxic antibodies on tumor cells and their possible role in controlling metastases. 11. Bull. Schweiz. Akad. med. Wiss. 1964

68. WISSLER and FLAX, M.H. : Cytotoxic effects of antitumor serum. Ann. New York Acad. of Sciences. Part IV. Host-Cell Response P. 773 - 794

69. ZEISS, J. : Genetische und immunologische Grundlage der Gewebe und Organtransplantation. Hippokrates Jg. 41, H. 1, 197o

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. H. LIMBURG, Direktor der Universitäts-Frauenklinik Homburg/Saar, für die Überlassung dieses interessanten Themas herzlich bedanken.
Ebenso gilt mein Dank Herrn Oberarzt Privatdozent Dr. med. TRANEKJER, der mir bei theoretischen und sachlichen Fragen jederzeit zur Seite stand und der die Durchsicht der Arbeit übernahm.
Sehr zum Dank verpflichtet bin ich auch dem Personal des Gewebezuchtlabors unter Leitung von Frau A. BRACHETTI, das mich bei meiner Arbeit stets unterstützte.

LEBENSLAUF

Am 1. November 1942 wurde ich als Sohn der Eheleute Wladimir HUL und Stephanie HUL, geb. Paprocki, in Metz geboren.

In Saarbrücken besuchte ich die Volksschule, aus der ich 1957 entlassen wurde. Anschließend begann ich eine Maschinenschlosserlehre bei der Firma Erhardt & Sehmer in Saarbrücken, die ich nach 3 1/2 Jahren erfolgreich abschloß. Während der Lehrzeit besuchte ich abends die Berufsaufbauschule in Saarbrücken, wo ich nach dreijähriger Schulzeit im Sommer 1961 die Fachschulreife erlangte.

Von 1962 bis 1965 besuchte ich das Saarlandkolleg in Saarbrücken und erwarb hier die Hochschulreife.

Im Sommersemester 1965 begann ich mit dem Medizinstudium an der Universität des Saarlandes.

1966 bestand ich das Vorphysikum und 1968 das Physikum.